

经皮肝动脉化疗栓塞治疗后肝细胞癌患者血管生成素-2基因多态性与预后的相关性

孙邱¹, 刘曙民¹, 张小宾² (1.宝鸡市人民医院 介入科, 陕西 宝鸡 721000; 2.宝鸡市人民医院 肝胆脾胰外科, 陕西 宝鸡 721000)

摘要: 目的 探讨经皮肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)治疗后肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)基因多态性与预后的相关性。方法 回顾性分析2013年1月至2015年1月于宝鸡市人民医院行TACE治疗的276例HCC患者的临床资料, 所有患者于TACE术前采集血液标本, 采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析法检测Ang-2基因+1087A/G位点多态性, 分析不同Ang-2基因型与患者预后的关系。结果 AA基因型患者1年、2年和3年生存率分别为63.6%、54.2%和50.8%, (AG + GG)基因型患者分别为52.5%、47.5%和36.7%, Log-rank分析结果显示两组生存曲线差异有统计学意义(Log-rank $P = 0.004$)。Cox多因素分析结果显示(AG + GG)基因型、肿瘤数目和TMN分期均为影响TACE术后HCC患者生存时间的独立危险因素,(AG + GG)基因型患者较AA基因型患者病死风险显著增加($OR = 1.670$, 95%CI: 1.068~3.136, $P = 0.007$)。结论 Ang-2 + 1087A/G基因多态性与经TACE治疗的HCC患者预后密切相关。

关键词: 血管生成素-2; 经皮肝动脉化疗栓塞; 肝细胞癌; 基因多态性

Association between angiotensin-2 gene polymorphism and prognosis of hepatocellular carcinoma patients after transcatheter arterial chemoembolization treatment

SUN Qiu¹, LIU Shu-min¹, ZHANG Xiao-bin² (1.Department of Interventional, Baoji People's Hospital, Baoji 721000, Shaanxi Province, China; 2.Department of Biliary and Spleen Pancreas Surgery, Baoji People's Hospital Baoji 721000, Shaanxi Province, China)

Abstract: Objective To investigate the association between angiotensin-2 (Ang-2) gene polymorphism and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) treatment. **Methods** The clinical data of 276 patients with HCC who underwent TACE treatment in Baoji People's Hospital from January 2013 to January 2015 were retrospectively analyzed. Blood samples were collected before TACE and the Ang-2 gene +1087A/G polymorphism was detected by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis. The correlations between genotypes and prognosis were analyzed. **Results** The 1-year, 2-year and 3-year survival rates of patients with AA genotype were 63.6%, 54.2% and 50.8%, respectively, which were 52.5%, 47.5% and 36.7% of patients with (AG + GG) genotype, respectively. Log-rank test showed highly significant differences in overall survival between different genotypes (Log-rank $P = 0.004$). Cox multivariate analysis showed that genotype AG + GG, tumor number and tumor-node-metastasis (TNM) stage were independently associated with HCC prognosis. The death risk in patients with (AG + GG) genotype was significantly higher than that of AA genotype ($OR = 1.670$, 95% CI: 1.068~3.136, $P = 0.007$). **Conclusion** Ang-2 gene +1087A/G polymorphism is closely related to the prognosis of patients with HCC after TACE treatment.

Key words: Angiotensin-2; Transcatheter arterial chemoembolization; Hepatocellular carcinoma; Gene polymorphism

肝癌是导致我国公民死亡的最主要恶性肿瘤之一,由于缺少首发症状,多数患者发现时已处于中晚期,失去了根治手术的时机。经皮肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是通过阻断或减少肿瘤的血供,使肿瘤组织缺血缺氧坏死,以达到治疗目的,现已成为晚期肝癌姑息治疗最主要的手段之一^[1-3]。近年来,有研究发现血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)参与肿瘤新生血管的形成,是肿瘤生长和转移的重要影响因素^[4,5]。还有研究发现Ang-2表达与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织分化程度相关,可作为评估肝癌切除术预后的预测因子^[6]。随着分子生物学的进展,有研究表明Ang-2基因存在多个与Ang-2表达水平和稳定性相关的核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点^[7,8]。基于上述研究结果,有理由推测Ang-2基因多态性可能与HCC患者TACE预后相关。因此,本研究通过检测276例经TACE治疗的HCC患者Ang-2基因+1087A/G的基因型,探讨+1087A/G基因多态性与患者预后的相关性,为临床工作提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象 回顾性分析2013年1月至2015年1月于宝鸡市人民医院介入科行TACE治疗的HCC患者的临床资料。纳入标准:①18岁<年龄≤80岁;②HCC诊断明确,经病理检查确认;③术前检查无肝外转移;④随访资料完整;⑤出生并长期生活于陕西地区的汉族人,彼此无血缘关系;⑥患者及家属完全知情同意。排除标准:①其他类型肝癌;②KPS评分<90分;③中大量腹水;④凝血功能障碍。本研究共纳入276例患者,其中男158例,女118例,年龄36~75岁,中位年龄54岁。

1.2 研究方法

1.2.1 TACE治疗方案 患者取仰卧位,利多卡因局部浸润麻醉后,以Seldinger法穿刺右侧股动脉,常规行肝动脉及肠系膜上动脉造影以明确肿瘤位置、大小及主要供血血管,通过微导管尽可能超选择插管至肿瘤供血动脉,经导管予以药物灌注化疗,化疗药物通常在以下药物中选择2~3种,包括:奥沙利铂(50~150 mg/m²)、表柔比星(30~50 mg/m²)、5-氟尿嘧啶(500~600 mg/m²)和羟喜树碱(50~150 mg/次),再以碘油混合乳剂栓塞肿瘤供血动脉,碘油用量由肿瘤大小及血供决定。根据栓塞情况,必要时可加用明胶海绵颗粒栓塞,直至再次造影显示对比剂反流或淤滞时结束手术。根据患者治疗反应、肿瘤复发及肝功能状况确定下次TACE时

间,通常间隔1~3个月。本研究276例患者共计行TACE 518次,行2次及以上者共174例,两次平均间隔为2.3个月。

1.2.3 基因多态性检测 所有患者入院后第2天,TACE治疗前,采集清晨空腹外周静脉血3 ml,按DNA提取试剂盒说明书提取基因组DNA。采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析法检测Ang-2基因+1087A/G位点多态性,通过PCR扩增及限制性内切酶酶切,将酶切产物进行电泳,紫外灯下观察并摄片,如图1。本研究PCR引物由上海Invitrogen公司提供,上游:5'-CATTAGAATAGCCTTCAC-3',下游:5'-GAGTGTCTTACTGACTAAAGG-3';限制性内切酶为EcoI 57 I。

1.2.4 随访 每3个月通过门诊或电话随访1次,随访期为首次TACE日起至患者死亡,或至随访截止时间2017年12月31日。生存期为疾病确诊之日起到因肿瘤或其并发症死亡的时间。

1.3 统计学处理 采用SPSS 19.0统计软件进行数据处理,计数资料以构成百分比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验;生存分析采用Kaplan-Meier生存曲线,差异性分析采用Log-rank检验;采用Cox比例风险回归模型进行预后影响因素的多因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 随访结果 276例患者随访期为29~57个月,中位随访期为35个月。随访期间186例(67.4%)病死,1年、2年和3年的累积生存率分别为57.2%、50.4%和42.8%。

2.2 基因型分布 276例患者中,Ang-2 +1087A/G位点AA、AG和GG基因型分别为118例(42.8%)、113例(40.9%)和45例(16.3%),基因型分布经检验均符合Hardy-Weinberg遗传平衡($\chi^2 = 3.946$, $P = 0.139$),具有群体代表性。

2.3 Ang-2基因多态性与临床特征的关系 不同性别、年龄、BMI、乙型肝炎病毒感染情况、是否合并肝硬

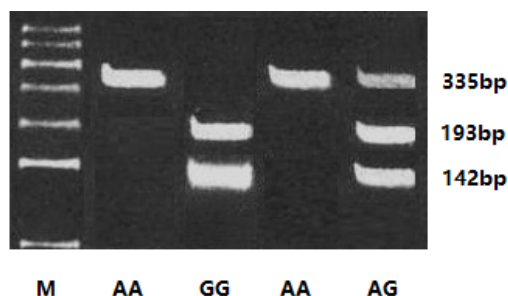


图1 Ang-2 +1087A/G 基因型电泳图

化、TNM 分期, Child-Pugh 分级, 肿瘤数目, 肿瘤直径及术前 AFP 水平与患者 Ang-2 +1087A/G 位点基因型 (AA、AG 和 GG) 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.4 Ang-2 基因多态性与预后的相关性 AA 基因型和 (AG + GG) 基因型患者的 1 年生存率分别为 63.6%、52.5%, 2 年生存率分别为 54.2%、47.5%, 3 年生存率分别为 50.8%、36.7%。Log-rank 分析显示, 两者生存曲线差异有统计学意义 (Log-rank $P = 0.004$), 如图 2。

2.5 生存因素分析 单因素分析显示, HBV 感染、肝硬化、TNM 分期、Child-Pugh 分级、肿瘤数目、肿瘤直径及术前 AFP 水平均与患者生存时间相关

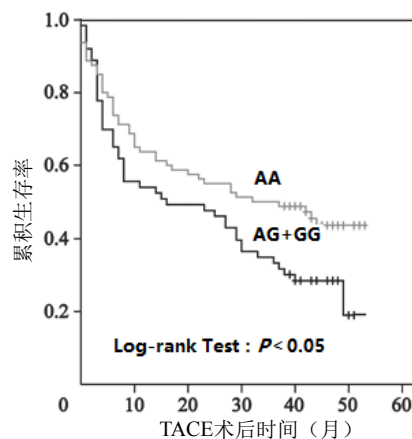


图 2 Ang-2 +1087A/G 基因多态性与 HCC 患者 TACE 术后生存曲线

表 1 Ang-2 +1087A/G 基因多态性与临床特征的相关性

项目	例数	AA [例 (%)]	AG [例 (%)]	GG [例 (%)]	χ^2 值	P值
年龄 (岁)						
< 60	209	93 (44.5)	86 (41.1)	30 (14.4)	2.630	0.268
≥ 60	67	25 (37.3)	27 (40.3)	15 (22.4)		
性别						
男	220	92 (41.8)	91 (41.4)	37 (16.8)	0.445	0.801
女	56	26 (46.4)	22 (39.3)	8 (14.3)		
BMI (kg/m ²)						
< 22	198	86 (43.4)	80 (40.4)	32 (16.2)	0.134	0.935
≥ 22	78	32 (41.0)	33 (42.3)	13 (16.7)		
HBsAg						
(+)	224	96 (42.9)	93 (41.5)	35 (15.6)	0.436	0.804
(-)	52	22 (42.3)	20 (38.5)	10 (19.2)		
肝硬化						
有	204	87 (42.6)	88 (43.1)	29 (14.2)	3.015	0.221
无	72	31 (43.1)	25 (34.7)	16 (22.2)		
TNM分期						
I + II	113	55 (48.7)	43 (38.1)	15 (13.3)	3.035	0.219
III+IV	163	63 (38.7)	70 (42.9)	30 (18.4)		
Child-Pugh分级						
B级	193	88 (45.6)	76 (39.4)	29 (15.0)	2.239	0.326
C级	83	30 (36.1)	37 (44.6)	16 (19.3)		
肿瘤数目 (个)						
1	165	66 (40.0)	72 (43.6)	27 (16.4)	1.456	0.483
≥ 2	111	52 (46.8)	41 (36.9)	18 (16.2)		
肿瘤直径 (cm)						
< 5	95	44 (46.3)	34 (35.8)	17 (17.9)	1.594	0.451
≥ 5	181	74 (40.9)	79 (43.6)	28 (15.5)		
术前AFP (ng/ml)						
< 400	121	48 (39.7)	52 (43.0)	21 (17.4)	0.843	0.656
≥ 400	155	70 (45.2)	61 (39.4)	24 (15.5)		

($P < 0.05$), 性别、年龄、体重指数及 TACE 次数与患者生存时间无显著相关性 ($P > 0.05$), 见表 2。采用 Cox 比例风险模型的 Forward: Wald 进

行多因素分析显示, (AG + GG) 基因型、肿瘤数目和 TNM 分期均是影响 TACE 术后 HCC 患者生存时间的独立危险因素 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 HCC 患者 TACE 术后生存时间的单因素分析

项目	例数	生存率[例(%)]			F值	P值
		1年	2年	3年		
年龄(岁)						
< 60	209	123 (58.9)	108 (51.7)	90 (43.1)	4.344	0.134
≥ 60	67	35 (52.2)	31 (46.3)	28 (41.8)		
性别						
男	220	126 (57.3)	113 (51.4)	94 (42.7)	0.420	0.840
女	56	32 (57.1)	26 (46.4)	24 (42.9)		
BMI (kg/m ²)						
< 22	198	116 (58.6)	101 (51.0)	82 (41.4)	0.231	0.332
≥ 22	78	42 (53.8)	38 (48.7)	36 (46.2)		
HBsAg						
(+)	224	124 (55.4)	110 (49.1)	94 (42.0)	5.763	0.041
(-)	52	34 (65.4)	29 (55.8)	24 (46.1)		
肝硬化						
有	204	107 (52.5)	98 (48.0)	83 (40.7)	7.138	0.017
无	72	51 (70.8)	41 (56.9)	35 (48.6)		
TNM分期						
I + II	113	71 (62.8)	63 (55.8)	56 (50.0)	10.367	0.009
III+IV	163	87 (53.4)	76 (46.6)	62 (38.0)		
Child-Pugh分级						
B级	193	117 (60.6)	100 (51.8)	87 (45.1)	5.759	0.043
C级	83	41 (49.4)	39 (47.0)	31 (37.3)		
肿瘤数目(个)						
1	165	100 (60.6)	91 (55.2)	78 (47.3)	21.245	< 0.001
≥ 2	111	58 (52.3)	48 (43.2)	40 (36.0)		
肿瘤直径(cm)						
< 5	95	57 (60.0)	53 (55.8)	45 (47.4)	5.924	0.034
≥ 5	181	101 (55.8)	86 (47.5)	73 (40.3)		
术前AFP (ng/ml)						
< 400	121	74 (61.2)	65 (53.7)	59 (48.8)	6.021	0.031
≥ 400	155	84 (54.2)	74 (47.7)	59 (38.1)		
TACE次数						
1	132	80 (60.6)	70 (53.0)	61 (46.2)	4.679	0.073
≥ 2	144	78 (54.2)	69 (47.9)	57 (39.6)		

表 3 HCC 患者 TACE 术后生存时间的 Cox 模型多因素分析

变量	B	S.E	Wald	OR	95%CI	P值
(AG + GG) 基因型	0.513	0.228	5.059	1.670	1.068~3.136	0.007
肿瘤数目	0.812	0.690	1.386	2.253	1.140~7.138	0.001
TNM分期	0.162	0.428	0.143	1.176	1.030~5.092	0.011

3 讨论

TACE是通过栓塞肿瘤供血血管的方式延缓肿瘤进展,是目前中晚期肝癌患者最主要的治疗手段之一。新生血管形成是肿瘤转移和进展的关键,涉及血管生成的因子被认为可能与肿瘤的发展和预后相关。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现的活性最强的血管生成因子,VEGF表达水平与原发性肝癌的发生、发展和转归密切相关^[9,10]。有研究表明TACE术后患者血清中VEGF水平显著增加,提示其可能是TACE术后肿瘤复发和转移的机制之一^[11],还有研究表明VEGF基因存在多个SNP位点,可能与肝癌易感性及TACE术后预后相关^[12]。

Ang-2是非VEGF通路中刺激肿瘤新生血管形成最重要的因子之一,已被广泛证实参与多种肿瘤的发生发展过程。多数研究结果显示Ang-2水平越高,新生血管越多,肿瘤恶性程度越高^[4,5,13]。Ang-2参与肿瘤新生血管形成的主要机制是其可与Tie-2受体结合竞争性抑制Ang-1的功能,从而诱导激活多种基质金属蛋白酶,使血管内皮细胞间以及内皮细胞与基质细胞间连接松散,促进内皮细胞以出芽方式形成新生血管^[14-16]。有研究表明,TACE术后患者血清Ang-2水平亦显著增加,提示Ang-2同样可能参与TACE术后肝癌的复发和进展^[17,18]。Ang-2基因是Ang-2蛋白表达和活性的基础,因此,本研究推测Ang-2基因多态性可能参与TACE术后HCC患者的转归预后。

Ang-2基因位于人8号染色体的p23.1区,由8个内含子和9个外显子组成。2号外显子+759位点、4号外显子+1087位点和5号外显子+1233位点是目前研究最多的SNP位点,尤其+1087A/G位点基因多态性已被证实参与多种疾病病理过程的发生和进展^[8,19,20]。研究表明,+1087A/G位点基因多态性系同义突变,不会改变Ang-2蛋白的结构,但该位点突变可导致mRNA二级结构发生变化,进而影响Ang-2蛋白的表达,产生生物学效应^[21]。何泉等^[8,20]研究发现,(AG+GG)基因型的糖尿病患者血清Ang-2蛋白水平显著高于AA基因型患者。然而,目前该位点基因多态性与肿瘤疾病的相关性研究鲜有报道。本研究结果显示AA基因型HCC患者TACE术后1年、2年和3年的生存率均显著高于(AG+GG)基因型患者,校正HBV感染、肝硬化、TNM分期、Child-Pugh分级、肿瘤数目、肿瘤大小及术前AFP水平等混杂因素后,仍显示AA基因型患者的生存时间长于(AG+GG)基因型患者,提示+1087A/G多态

性是促使肿瘤复发和转移的重要因素;同时,本研究多因素分析结果还显示肿瘤数目和TNM分期也是影响HCC患者生存时间的独立危险因素,提示TACE术后患者生存时间的影响因素较多,全面收集患者资料对预测评估预后具有重要意义。

综上,本研究表明陕西地区经TACE治疗的HCC患者Ang-2 +1087A/G位点基因多态性与预后密切相关,AA基因型患者生存时间长于(AG+GG)基因型患者。当然,本研究也存在诸多不足:首先,本研究为单中心小样本研究,所得结果可能与真实世界存在偏差;其次,本研究限于条件仅选取了+1087A/G位点,可能存在其他SNP与肿瘤进展相关;最后,TACE后HCC患者预后相关因素十分复杂,不仅与局部复杂多变的病理环境相关,还可能是多基因共同表达的结果,Ang-2基因多态性与其他因素以及其他基因相互作用的具体机制也有待进一步开展。

参考文献

- [1] Lee HS, Kim JS, Choi IJ, et al. The safety and efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of patients with hepatocellular carcinoma and main portal vein obstruction[J]. *Cancer*, 2015, 79(11):2087-2094.
- [2] Zhao H, Liu F, Yue Z, et al. Association of hepatic vein Lipiodol tram-track sign during transcatheter arterial chemoembolization with perioperative death[J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(3):1148-1157.
- [3] Adachi E, Matsumata T, Nishizaki T, et al. Effects of preoperative transcatheter hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. The relationship between postoperative course and tumor necrosis[J]. *Cancer*, 2015, 72(12):3593-3598.
- [4] Le CT, Laidlaw G, Morehouse CA, et al. Synergistic actions of blocking angiopoietin-2 and tumor necrosis factor- α in suppressing remodeling of blood vessels and lymphatics in airway inflammation[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(11):2949-2968.
- [5] Li C, Li Q, Cai Y, et al. Overexpression of angiopoietin 2 promotes the formation of oral squamous cell carcinoma by increasing epithelial-mesenchymal transition-induced angiogenesis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(9):295-302.
- [6] Fang JH, Zhou HC, Zhang C, et al. A novel vascular pattern promotes metastasis of hepatocellular carcinoma in an epithelial-mesenchymal transition-independent manner[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2):452-465.
- [7] He L, Dang L, Zhou J, et al. Association of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and caspase-5 polymorphisms with psoriasis vulgaris[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2015, 40(5):556-563.
- [8] 何泉, 罗海明, 朱宝生, 等. Angiopoietin-2基因多态性与2型糖尿病及糖尿病慢性肾脏疾病的相关性研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2013, 21(4):315-321.
- [9] Guan Q, Gu J, Zhang H, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor levels and prognosis of hepatocellular carcinoma patients receiving radiofrequency ablation[J]. *Biotechnol*

- Biotechnol Equip,2015,29(1):119-123.
- [10] Zhang W, Kim R, Quintini C, et al. Prognostic role of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation[J]. Liver Transpl,2015,21(1):101-111.
- [11] Chen J, Lai L, Liu S, et al. Targeting HIF-1 α and VEGF by lentivirus-mediated RNA interference reduces liver tumor cells migration and invasion under hypoxic conditions[J]. Neoplasia,2016,63(6):934-940.
- [12] 王黎洲, 李兴, 宋杰, 等. 血管内皮生长因子基因型对介入化疗栓塞治疗原发性肝癌预后的评估[J]. 介入放射学杂志,2015,24(5):396-399.
- [13] He FF, Li HQ, Huang QX, et al. Tumor necrosis factor- α and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine are associated with elevated urinary angiopoietin-2 level in type 2 diabetic patients with albuminuria[J]. Kidney Blood Press Res,2015,40(4):355-365.
- [14] Cañadas I, Taus Á, Villanueva X, et al. Angiopoietin-2 is a negative prognostic marker in small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2015,90(2):302-306.
- [15] Wang F, Dong X, Xiu P, et al. T7 peptide inhibits angiogenesis via downregulation of angiopoietin-2 and autophagy[J]. Onco Rep,2015,33(2):675-684.
- [16] Oztutgan T, Demirel E, Tas D, et al. A comparative analysis of angiopoietin 2 immunohistochemical staining in various stages of lung cancer[J]. Niger J Clin Pract,2016,19(6):725-729.
- [17] Hsieh MY, Lin ZY, Chuang WL. Serial serum VEGF-A, angiopoietin-2, and endostatin measurements in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma treated by transcatheter arterial chemoembolization[J]. Kaohsiung J Med Sci,2011,27(8):314-322.
- [18] Ronald J, Nixon AB, Marin D, et al. Pilot evaluation of angiogenesis signaling factor response after transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma[J]. Radiology,2017,285(1):311-318.
- [19] Makhoul I, Todorova VK, Siegel ER, et al. Germline genetic variants in TEK, ANGPT1, ANGPT2, MMP9, FGF2 and VEGFA are associated with pathologic complete response to bevacizumab in breast cancer patients[J]. Plos One,2017,12(1):e0168550.
- [20] 何泉, 罗海明, 朱宝生, 等. 2型糖尿病及其肾病与血管生成素2基因多态性的关联分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2012,29(1):72-76.
- [21] 周晔, 冯虹. Ang2基因多态性与卵巢癌的相关性研究[J]. 中国妇幼保健,2010,25(8):1094-1095.

收稿日期: 2018-03-26

孙邱, 刘曙民, 张小宾. 经皮肝动脉化疗栓塞治疗后肝细胞癌患者血管生成素-2基因多态性与预后的相关性[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018,10(3):7-12.

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对来稿图片格式的要求

本刊要求来稿中的每张照片(图)片均应有必要的图题及说明性文字标注于图的下方,并在注释中标明图中使用的全部非公知公用的缩写;图中箭头标注应有文字说明。大体标本照片在图内应有尺度标记,病理照片要求注明特殊染色方法和高、中、低倍数。照片要求有良好的清晰度和对比度,并在背面标明图号、作者姓名及图的上下方向。说明文字应简短,不应超过50字,所有的图在文中相应部分应提及。电子图片采用jpg格式,分辨率不低于300像素/英寸,并应经过剪切后充分显示关键部分。

动态图像:分别按其在正文中出现的先后次序连续编码,文中应标记为“动态图 \times ”。视频资料要求图像清晰稳定,剪接顺畅,保持可能获得的最高清晰度模式,视频文件采用AVI格式,大小在5M以内。每个文件名均应与文中的名称相符,如“动态图 \times ”。

本刊编辑部